



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 43 34 935 C 1

21 Aktenzeichen: P 43 34 935.8-41
22 Anmeldetag: 13. 10. 93
23 Offenlegungstag: —
46 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 9. 3. 95

6 Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/00
C 12 Q 1/02
G 01 N 33/53
C 09 B 11/28
C 09 B 57/00
C 09 K 11/06
// (C12Q 1/02, C12R
1:725, 1:445, 1:125,
1:46, 1:19)

DE 43 34 935 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:
Husfeld, Luciana, 81477 München, DE

74 Vertreter:
Pfenning, J., Dipl.-Ing., 10707 Berlin; Meinig, K.,
Dipl.-Phys., 80336 München; Butenschön, A.,
Dipl.-Ing. Dr.-Ing., Pat.-Anwälte; Bergmann, J.,
Dipl.-Ing., Pat.- u. Rechtsanw., 10707 Berlin; Nöth, H.,
Dipl.-Phys.; Reitzle, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., 80336
München; Hengelhaupt, J., Dipl.-Ing., 01097
Dresden; Kraus, H., Dipl.-Phys., Pat.-Anwälte, 80336
München

72 Erfinder:
gleich Patentinhaber

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:
DE 41 17 459 A1
EP 4 35 226 A1
Referat aus der Datenbank Medline AN 92129613:
Martin-E., Bhakdi-S.;
J. Clin. Microbiol. 1991, 29 (9), S. 2013 - 2023;
Chemical Abstracts 97 (1982): 143021w: WEISDORF,
O.J. et al.;
Inflammation (N.Y.) 1982, 6 (3), S. 245 - 56;

54 Verfahren zur Bestimmung der Phagozytose- und/oder Killingfähigkeit

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der
Phagozytose- und/oder Killingfähigkeit von phagozytieren-
den Zellsystemen wie Granulozyten, Monozyten oder Makro-
phagen (Phagozyten), wobei Phagozyten mit einer definier-
ten Menge von mit Fluoreszenz-Farbstoff markierten Mikro-
organismen versetzt (Probe) und die so hergestellte Probe zu
einer definierten Menge Glucose enthaltendes gepuffertes
Nährmedium gegeben wird.
Anschließend wird in an und für sich bekannter Weise
inkubiert, und die Phagozytose und das Killing werden durch
Kühlung und/oder eine Stopplösung gestoppt.
Anschließend wird die Phagozytosefähigkeit und/oder die
Killingfähigkeit mittels eines Fluoreszenz-Zytometers be-
stimmt.

DE 43 34 935 C 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Phagozytose- und/oder Killing- und/oder Burstfähigkeit von Phagozyten und entsprechende Diagnosekits zur Durchführung dieser Verfahren.

Der Säuger-Organismus verfügt zur Abwehr von eindringenden Mikroorganismen sowie zur Beseitigung von alten und beschädigten Zellen oder Zelltrümmern über Mechanismen zur Aufnahme und anschließenden Auflösung dieser unerwünschten Bestandteile. Dabei werden zunächst die unerwünschten Bestandteile an der Oberfläche der zur Phagozytose befähigten Zellen, im wesentlichen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, im peripheren Blut oder Gewebe gebunden. Wenn diese zur Phagozytose spezialisierten Zellen den gebundenen Bestandteil als "fremd" erkennt, wird der Bestandteil von der Zelle umschlossen und anschließend abgetötet und abgebaut. Die Aufnahme der Mikroorganismen in die Phagozyten wird dabei als Phagozytose bezeichnet. Zur Vernichtung entwickeln dabei die Phagozyten (wie vorstehend beschrieben, im wesentlichen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) oxidative Stoffe, wie Peroxide (Burst), und weitere lytische Mechanismen, wie niedriger pH-Wert, verschiedene Enzyme, basische Polypeptide, um die Mikroorganismen abzutöten (Killing).

Verminderte Phagozytose- bzw. Killing- bzw. Burstfähigkeit werden unter anderem bei angeborenen Defekten, wie der chronischen granulomatösen Erkrankung (CGD), der Myeloperoxidase-Defizienz, dem Chediak-Higashi-Syndrom (CHD) und bei dem Infektions-Syndrom (HIE) gefunden. Neben den angeborenen Krankheiten können Defekte erworben werden, wie dieses bei Diabetes, Blutvergiftung (Sepsis), Traumata, Alkoholismus, Nierenversagen und verschiedenen Stoffwechselstörungen der Fall ist.

Für die klinische Diagnostik ist es deshalb wichtig, bei Vorliegen einer Immunschwäche festzustellen, inwieweit die Fähigkeit der Phagozyten zur Phagozytose bzw. Burst bzw. zum Killing beeinträchtigt ist.

Verschiedene Substanzen, wie z. B. Antibiotika, Zytostatika und Immunstimulantien sollen die Funktion der phagozytierenden Zellsysteme beeinflussen. Mittels des vorliegenden Tests läßt sich das Wirkungsspektrum der Medikamente auf Phagozytose, Burst und Killing ermitteln.

Aus der Literatur sind bisher verschiedene Verfahren bekanntgeworden, die eine Bestimmung der Phagozytose und des Burst ermöglichen.

Aus der DE-OS 41 17 459 und den darin aufgeführten weiteren Literaturzitate ist ein Bursttest bekannt. Dieser Bursttest wird so durchgeführt, daß eine Körperflüssigkeit mit einer definierten Menge von einem Leukozytenstimulans versetzt wird und anschließend eine Behandlung mit einer inaktiven Fluoreszenzsubstrat-Vorstufe durchgeführt wird. Nach einer Lysierung der Erythrozyten erfolgt eine Bestimmung der Fluoreszenz.

Aus der EP 0 435 226 ist weiterhin ein Verfahren zur Bestimmung der Phagozytosefähigkeit bekannt. Bei diesem Verfahren wird eine Körperflüssigkeit mit fluoreszenzmarkierten Bakterien versetzt und die Phagozytose nach einer bestimmten Inkubationszeit und einem Abstoppen der Phagozytose nach Anfärben mit einem fluoreszierenden DNA-Farbstoff mittels eines Fluoreszenz-Zytometers bestimmt.

Aus J. Clin. Microbiol. 1991, 29(9) S. 2013—2033, ist ein Verfahren zur Bestimmung des Killings bekannt. Ein

weiteres Verfahren ist in CA 97 (1982): 143021w beschrieben.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß die Verfahren des Standes der Technik keine exakten und vor allem keine reproduzierbaren Ergebnisse liefern.

Ausgehend hiervon, ist es die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren sowie entsprechende Diagnosekits zur Durchführung des Verfahrens zur Verfügung zu stellen, mit denen es möglich ist, einfacher, exakter und reproduzierbarer zu messen.

Die Aufgabe wird hinsichtlich des Verfahrens durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1 und des Anspruchs 17 gelöst, hinsichtlich der Diagnosekits durch die kennzeichnenden Merkmale der Ansprüche 21 bis 24. Die Unteransprüche zeigen vorteilhafte Weiterbildungen auf.

Mit diesem erfindungsgemäßen Verfahren steht nun eine universelle Methode zur Bestimmung der Phagozytose- und/oder der Burst- und/oder der Killingfähigkeit zur Verfügung. Das Verfahren zeichnet sich besonders durch seine Einfachheit und seine exakten Meßergebnisse aus. Besonders zu erwähnen ist, daß mit der vorgeschlagenen Methode simultan die Phagozytose, die Burst- und die Killingfähigkeit gemessen werden können.

Erfindungswesentlich bei dem vorgeschlagenen Verfahren ist, daß im Gegensatz zu der bisherigen Vorgehensweise die Zellen zur Bestimmung der Phagozytose und/oder des Burst erst nach der Phagozytose mit Antikörper markiert werden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß durch das Markieren mit Antikörpern der Phagozytoseprozeß angeregt wird, was sich somit ungünstig auswirkt, wenn die Markierung bereits am Beginn erfolgt. Außerdem werden durch die Antikörpermarkierung verschiedene Waschvorgänge erforderlich, die ebenfalls zur Phagozytenbeeinträchtigung führen.

Bei den Verfahren des Standes der Technik erfolgt hingegen die Markierung der Phagozyten bereits im ersten Verfahrensschritt mit einem direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper. Dagegen wird erfindungsgemäß so vorgegangen, daß zuerst nur eine Färbung der Mikroorganismen durchgeführt wird, und zwar in der Weise, daß ein nichttoxischer, nicht-pH-empfindlicher stabiler Farbstoff eingesetzt wird.

Das Verfahren kann dabei mit verschiedenen Arten von Mikroorganismen ausgeführt werden. Besonders bevorzugt ist die Anwendung von Hefen, Pilzzellen und grampositiven sowie gramnegativen Bakterien als Zellen. Ganz besonders bevorzugt ist die Verwendung von Hefen, und hier insbesondere von *Candida albicans*. Wichtig ist, daß lebende Mikroorganismen eingesetzt werden.

Die Fluoreszenz-Farbstoffe zum Anfärben der Mikroorganismen müssen verschiedene Anforderungen erfüllen:

- Stabile Verbindung zwischen Farbstoff und Mikroorganismus;
- der Farbstoff muß während Phagozytose, Burst und Killing ausreichend stabil sein;
- der Farbstoff darf weder die Funktion der Mikroorganismen noch der Phagozyten beeinflussen.

Beispiele hierfür sind:

- Rhodamine
- Thiazolorange
- Sulforhodamine

- 5(6)Carboxy-2,7-dichlorfluoresceindiacetatsuccinimidester
- 5(6)Carboxyeosin-diacetat-succinimidester
- 5-Chlormethyleosin-diacetat
- 5-Chlormethylfluorescein-diacetat
- 5(6)-(((chloromethyl)benzoyl)amino)-tetramethylrhodamin
- 8-Chlormethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-3-indacen
- 5-Carboxy-fluorescein-diacetat-acetoxymethylester
- 8-Brommethyl-4,4-difluor-1,3,5,7-tetramethyl-4-bor-3a,4a-diaza-s-indacen
- 2,7-bis-(2-carboxymethyl)-5(6)carboxyfluorescein-acetoxy-methylester
- Tetramethylrhodamin, -rosamin
- Tetramethylrhodaminmethyl(oder ethyl)ester, desgl. Tetramethylrosaminmethyl(oder ethyl)ester
- 5,5',6,6'-Tetrachlor-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanin-jodid
- Merocyanin
- Calcein-acetoxy-methylester.

Die Auswahl des Farbstoffes hängt dabei davon ab, welche Mikroorganismen für den Test verwendet werden. Besonders bevorzugt ist es, bei Hefen Calcein-acetoxymethylester als Farbstoff einzusetzen. Andere geeignete Farbstoffe sind bei Hefen und grampositiven Bakterien:

- 5(6) Carboxy-2',7'-dichlorfluorescein-diacetat-succinimidester,
- 5-Chlormethyleosin-diacetat.

Für gramnegative Bakterien eignen sich insbesondere Rhodamin, Sulforhodamin, Thiazolorange, 5(6)Carboxyfluorescein-N-hydroxy-succinimidester.

Es hat sich gezeigt, daß ein weiterer erfindungswesentlicher Punkt des Verfahrens darin zu sehen ist, daß nach Versetzen der Mikroorganismen mit den Phagozyten die so erhaltene Probe mit einer speziell gepufferten Nährlösung versetzt wird (Verfahrensschritt b). Diese verwendete Nährlösung ist deshalb sehr wichtig, da während der Phagozytose des Burst und des Killings die Granulozyten sehr viel Glucose und andere gelöste Substanzen verbrauchen. Zudem ist ein ausreichendes Nährstoffangebot entscheidend, daß es bei Hefen nicht zur Bildung von Pseudohyphen kommt, die ansonsten nur durch Anti-Mykotika oder Antibiotika unterdrückt werden könnten. Auch geringe Konzentrationen dieser Medikamente beeinflussen den Testablauf, da sie das Killing von Candida erleichtern. Erfindungsgemäß wird deshalb eine glucosereiche Nährlösung verwendet. Besonders bevorzugt wird hierbei ein RPMI-Nährmedium der Firma SIGMA verwendet. Das gepufferte Nährmedium wird dabei auf einen pH-Bereich von 7,2 bis 7,5 — bevorzugt von 7,4 bis 7,5 — bei 37°C eingestellt. Der Glucoseanteil liegt dabei zwischen 0,4 und 20%, bevorzugt bei 0,45%.

Nach bevorzugten Ausführungsformen wird weiter vorgeschlagen, beim Verfahrensschritt a) sowohl die Mikroorganismen als auch die Phagozyten mit einem derartigen Puffer zu versetzen und anschließend die Phagozyten- und die Mikroorganismen-Konzentration zu bestimmen.

Erfindungsgemäß ist es weiter bevorzugt, daß die Inkubationszeit (Verfahrensschritt c) 0 bis 120 min bei 30 bis 40°C — bevorzugt bei 35 bis 38°C — beträgt.

Das Abstoppen (Verfahrensschritt d) der Phagozytose wird erfindungsgemäß dadurch erreicht, daß entwe-

der eine Eiskühlung und/oder eine Stopplösung verwendet wird. Bevorzugt ist es hierbei, eine Stopplösung unter gleichzeitiger Eiskühlung einzusetzen. Es hat sich hierbei gezeigt, daß es besonders günstig ist, wenn N-Ethylmaleinsäureimid (NEM) verwendet wird. Dadurch wird erreicht, daß die Phagozytose abgestoppt wird, andererseits aber das Anheften der Antikörper nicht beeinträchtigt wird.

Die Bestimmung der Phagozytose erfolgt nun in der Weise, daß nach Abstoppen der Probe diese mit einem direkt markierten Antikörper versetzt wird. Der Antikörper kann entweder selbst mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt sein, oder es wird mit einem Fluoreszenz-Farbstoff direkt markierten Antikörper gearbeitet.

Folgende Antikörper sind geeignet:

CD 13, CD 14, CD 15 oder CD_w-65 (CD = cluster of differentiation).

Als Farbstoff zum Koppeln sind kommerziell erhältlich:

Fluorescein, Phycoerythrin, Tandemfarbstoffe und Texas Red.

Bevorzugt ist es dabei, wenn vor der Markierung eine Zentrifugation erfolgt.

Anschließend erfolgt die Bestimmung der Phagozytose mittels eines Fluoreszenz-Durchflußzytometers nach einer an sich bekannten Verfahrensweise.

Ein besonderer Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß nicht nur die Phagozytose, sondern auch das Killing bestimmt werden kann. Dazu wird, ausgehend vom Verfahrensschritt d), d. h. nach dem Abstoppen der Phagozytose, eine Lysierung der Zellen durchgeführt und anschließend eine Markierung mit einem membranimpermeablen Fluoreszenz-Farbstoff vorgenommen. Durch eine spezielle Lyselösung und ein aufeinander abgestimmtes Verfahren von Inkubation bei 37°C und anschließender Zentrifugation konnte eine schonende Lysierung der Phagozyten erreicht werden. Die in der Literatur bekannten Detergentienlösungen oder bidestilliertes Wasser führen insbesondere bei Hefen als Testorganismen zu nicht unbeträchtlichen Schädigungen der Mikroorganismen und damit zu unsicheren Resultaten. Die Verwendung eines membranimpermeablen Fluoreszenz-Farbstoffes mit hoher Reaktivität zu Nukleinsäuren empfiehlt eine sichere Detektion der abgetöteten oder absterbenden Mikroorganismen. Phagozyten lysieren die Zellwand der phagozytierten Mikroorganismen, und damit kann der Farbstoff in die Zellen dringen. Es hat sich gezeigt, daß bei Markierung von lebenden Mikroorganismen mit einem membrangängigen Farbstoff bei Abtöten der Mikroorganismen (durch die Phagozyten) der Farbstoff nur langsam aus den Zellen diffundiert. Deshalb ist — wie in der Literatur beschrieben — die Entfärbung der Mikroorganismen ein ungenügendes Kriterium zur Aussage über die Killingaktivität. Anstelle der Lysierung kann auch eine Ultraschallbehandlung durchgeführt werden. Auch hierbei ist es wieder bevorzugt, wenn nach der Lysierung eine Zentrifugation erfolgt. Als Fluoreszenz-Farbstoffe zur Detektion des Killings sind besonders Thiazolium- oder Oxazolium-Verbindungen geeignet, insbesondere die folgenden:

- Acridin-homodimer (bis-(6-chloro-2-methoxy-9-acridinyl)spermin)
- 9-Amino-6-chloro-2-methoxyacridin
- Ethidium-acridin-heterodimer
- Ethidium-bromid

- Ethidium-homodimer (z.Zt. homodimer-1 und homodimer-2 erhältlich)
- Ethidium-diazid
- Ethidium-monoazid
- Propidiumjodid
- Benzothiazolium-4-quinolinium-dimer
- Benzoxazolium-4-quinolinium-dimer.

Geeignet sind auch Farbstoffe, die Nucleinsäuren anfärben.

Die Bestimmung erfolgt analog der Phagozytose wieder im Durchflußzytometer.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann nun so angewandt werden, daß entweder ein Testansatz verwendet wird und nach Abstoppen der Lösung dieser in Teillösungen aufgeteilt wird, so daß die Phagozytose und auch das Killing bestimmt werden können. Andererseits ist es aber genauso möglich, separate Ansätze sowohl für die Phagozytose als auch das Killing durchzuführen.

Ganz besonders vorteilhaft bei dem vorgestellten Verfahren ist es, daß nicht nur die Phagozytose und/oder das Killing bestimmt werden kann, sondern durch geringfügige Variation auch noch der Burst bestimmt werden kann (Patentanspruch 17). Dadurch ist es nun möglich, die vorstehend beschriebenen Verfahren in der Weise abzuwandeln, daß die Granulozyten im Verfahrensschritt a), b) oder c) mit einer farblosen membranängigen Substanz, die durch die nachfolgende Oxidation zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird, behandelt wird. Bevorzugte derartige Farbstoffe sind:

- Dichlordihydrofluorescein
- 2,7-Dichlordihydrofluorescein-diacetat-succinimidester
- Dihydrorhodamin
- Dihydroethidium
- 2,7-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
- Dihydrotetramethylrosamin
- Dihydrofluoresceindiacetat
- 5(6)-Carboxy-2,7-dichlordihydrofluoresceindiacetat
- 5(6)-Carboxy-2,7-dichlordihydrofluoresceindiacetat-bis(acetoxymethyl)ester
- 4-Carboxydhidrotetramethylrosamin-succinimidester.

Somit ist es möglich, mit einem Verfahren sowohl die Phagozytose- und/oder Burst- und/oder Killingfähigkeit zu bestimmen.

Das Verfahren kann aber weiter noch dahingehend abgewandelt werden, daß anstatt der Phagozyten im Verfahrensschritt a) mit Vollblut oder aus Vollblut bzw. Gewebe gewonnenen phagozytisierenden Zellsystemen gearbeitet wird. Eine weitere Variationsmöglichkeit besteht noch darin, daß ein Quenchen in an sich bekannter Weise bei den Mikroorganismen vorgenommen wird.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagentienkit zur Bestimmung der Phagozytose, des Killings und des Burst. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagentienkit zur Bestimmung der Phagozytose und/oder des Killings und/oder des Burst. Der Reagentienkit zur Bestimmung der Phagozytose enthält bevorzugt — getrennt voneinander — lyophilisierte Mikroorganismen, einen Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen, eine Puffersubstanz und einen direkt markierten Antikörper zur Detektion der Phagozyten. Der Reagentienkit zur Bestimmung des

Killings enthält entsprechend lyophilisierte Mikroorganismen, einen Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen, eine Puffersubstanz, eine Lyselösung sowie einen Farbstoff zur Einfärbung der toten Zellen. Der Reagentienkit zur Bestimmung des Burst enthält vorzugsweise lyophilisierte Mikroorganismen, einen Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen, eine Puffersubstanz, eine farblose membranängige Substanz, die durch nachfolgende Oxidation zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird, direkt markierte Antikörper zur Detektion der Phagozyten. Der Reagentienkit zur Bestimmung der Phagozytose und/oder des Burst und/oder des Killings enthält vorzugsweise lyophilisierte Mikroorganismen, einen Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen, eine Puffersubstanz, eine farblose membranängige Substanz, die durch nachfolgende Oxidation zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird, direkt markierte Antikörper zur Detektion der Phagozyten, eine Lyselösung.

Bevorzugt ist es dabei, wenn die lyophilisierten Mikroorganismen eine Hefe, hier insbesondere *Candida albicans* ist. Der Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen ist bevorzugt Calceinacetoxymethylester. Nach einer bevorzugten Ausführungsform ist weiterhin vorgesehen, daß der Farbstoff zur Anfärbung toter Zellen Ethidium-homodimer-1 und der Farbstoff zur Messung der Burstaktivität Dihydroethidium ist. Bevorzugt ist es weiterhin, wenn der Reagentienkit noch ein Nährmedium enthält. Weitere Ausführungsformen sehen vor, daß der Reagentienkit zusätzlich eine Quenchlösung und/oder eine Lösung zur Lyse der Erythrozyten für die Vollblutmethode enthält.

Das vorstehend beschriebene Verfahren kann nun verschieden angewendet werden:

1. Einwirkung von Substanzen auf Granulozyten/Monozyten

Mit der vorliegenden Testmethode können außer dem Erkennen von best. Krankheiten verschiedene Stoffe auf deren Einfluß auf die Phagozytose-, Burst- und Killingfähigkeit von Granulozyten, Makrophagen und/oder Monozyten getestet werden.

2. Einwirkung von Substanzen auf Mikroorganismen

Außerdem kann — durch Einwirken der zu untersuchenden Stoffe auf Mikroorganismen — untersucht werden, ob durch eine Schädigung der Mikroorganismen die Aktivität der Granulozyten/Monozyten geändert wird.

3. Einwirkung von Substanzen auf Granulozyten/Monozyten und Mikroorganismen

Durch die Zugabe der zu untersuchenden Substanz zum zellreichen Plasma wie zu den Mikroorganismen kann der Substanzeinfluß als gemeinsamer Effekt getestet werden.

Zur praktischen Durchführung der Tests von Substanzeinflüssen kann die im zellreichen Plasma und/oder im Testansatz vorliegende RPMI-Menge z. T. durch die zu untersuchende Chemikalie ersetzt werden. Bei festen Substanzen empfiehlt sich eine Lösung der Substanz in RPMI, das dann im Test verwendet werden kann. In vielen Fällen ist eine gesonderte Inkubation der Zellen mit den Teststoffen — vor dem Zusammengehen des zellreichen Plasma mit Mikroorganismen — durchzuführen.

Ein Parallelansatz ohne die zu untersuchende Substanz dient als Vergleichsmessung.

Weitere Merkmale, Einzelheiten und Vorzüge der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung eines Ausführungsbeispiels mit den Fig. 2 bis 4 sowie anhand der Fig. 1, die das Prinzip des Testes zeigt.

Fig. 1 zeigt schematisch den Ablauf des Testprinzips für die Bestimmung der Phagozytose und/oder des Killings anhand von *Candida albicans* als Mikroorganismen.

Fig. 2 bis 4 zeigen die Histogramme für die Phagozytose, den Burst und das Killing.

Die Einzelheiten des Verfahrensablaufes sind in dem nachstehenden Ausführungsbeispiel detailliert erörtert, das sich ebenfalls auf *Candida albicans* bezieht.

Herstellung von mit Calcein markierten *Candida albicans* Hefen

Material:

1. *Candida albicans* DSM 1386 (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen)
2. Calcein-AM (Molecular Probes, Best.Nr. C-3100)
3. Dimethylsulfoxid (Sigma, Best.Nr. D-5879)
4. Tryptic Soy Broth (Difco)
5. Kaliumchlorid (Sigma, Best.Nr. P-4504)
6. Monokaliumphosphat anhydr. (Sigma, Best.Nr. P-5379)
7. Natriumchlorid (Sigma, Best.Nr. S-7653)
8. D-Glucose (Sigma, Best.Nr. G-7528)
9. Humanes AB-Serum verschiedener Probanden (Sigma, Best.Nr. S-7148)
10. Reagenzgläser 15ml (Schott)
11. Brutschrank (Heraeus)
12. Zentrifuge (Heraeus, Sepatech, Megafuge 1,0)
13. Vortex-Genie (Bender & Hobein)
14. Thermomixer (Eppendorf, Best.Nr. 5436)
15. Reagenzgefäße (Eppendorf, Best.Nr. 3810, blau, 1,5ml)
16. Zählkammer Neubauer improved (Bender & Hobein)
17. Fluoreszenzmikroskop (Leitz)
18. Durchflußzytometer (Coulter, Profile II mit Power Pack)
19. RPMI-Nährmedium (Sigma, Best.Nr. D-8005)
20. NaHCO_3 (Sigma, Best.Nr. S-8875)
21. Dimethylsulfoxid (Sigma, Best.Nr. D-8779)
22. Zentrifuge (Heraeus, Biofuge 15)

Hergestellte Lösungen

Nährlösung: Tryptic-Soy-Broth
30g Tryptic-Soy-Broth werden in einem Liter bidest. Wasser gelöst und zu je 10 ml auf Reagenzgläser mit 15 ml Inhalt verteilt.

PBS-Glucose-Lösung: (PBS-Glu-Lösung)

0,2 g Kaliumchlorid, 0,2 g Monokaliumphosphat, 4,5 g D-Glucose und 7,9 g Natriumchlorid werden in einem Liter bidest. Wasser gelöst; anschließend wird sterilfiltriert (Filter: 0,2 µm), und die Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Calcein-AM

Je 50 µg Calcein-AM werden in 35 µl Dimethylsulfoxid gelöst und bei -20°C eingefroren aufbewahrt. Vor der Verwendung wird die Lösung aufgetaut.

RPMI-1640

1,636g RPMI-1640 werden in 90ml bidest. Wasser gelöst. Dazu gibt man 0,2 g NaHCO_3 . Diese Lösung wird bei 20°C mittels NaOH auf pH 7,4–7,5 eingestellt. Ein Aliquot der Lösung wird entnommen und auf 37°C erwärmt; der pH-Wert soll hier 7,2–7,4 betragen. Falls das nicht der Fall ist, wird die Lösung bei 20°C entsprechend geändert. Die RPMI-1640-Lösung wird auf 100 ml aufgefüllt, anschließend sterilfiltriert (Filter: 0,2 µm) und ist für ca. 1 Woche im Kühlschrank haltbar.

Färbung und Opsonierung der Hefenzellen

Die lyophilisierten Mikroorganismen werden auf einer Blutagar-Platte über Nacht ausgestrichen und bei ca. 37°C angezüchtet. Drei bis vier *Candida*-Kolonien davon werden in ein Reagenzglas mit 10 ml Nährbouillon (Tryptic-Soy-Broth) überführt und für 10 Stunden bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Anschließend wird die so erhaltene Hefenkultur bei 500 × g, 3 Minuten (bei Zimmertemperatur) abzentrifugiert. Der Rückstand wird in 500 µl PBS-Glu-Lösung aufgenommen und mittels Zählkammer auf $1,5 \times 10^8$ Zellen/ml in PBS-Glu-Lösung eingestellt. Ein Milliliter der eingestellten *Candida*-Suspension wird mit 5 µl Calcein-AM versetzt und für eine Stunde im Thermomixer bei 37°C und 1100 U/min geschüttelt. Die Kontrolle der Färbung erfolgt im Fluoreszenz-Mikroskop und im Durchflußzytometer: im Mikroskop müssen die Zellen bei Blaulicht-Anregung intensiv grün gefärbt sein, und im Durchflußzytometer muß eine deutliche Intensität in Fluoreszenz-1 zu messen sein. Anschließend werden die Zellen dreimal in PBS-Glu-Lösung gewaschen, um überflüssiges Calcein-AM zu entfernen. Hierzu werden die Zellen bei 500 × g für 3 min bei Zimmertemperatur zentrifugiert; der Überstand wird entfernt und der Rückstand in 1ml PBS-Glu-Lösung aufgenommen. Nach dem letzten Zentrifugieren werden die Zellen in 1,8 ml PBS-Glu-Lösung aufgenommen und mit 200 µl Serum versetzt. Diese Lösung wird auf zwei Eppendorf-Reagenzgläser verteilt und bei 37°C, 1100 U/min, für 15 Minuten im Thermomixer geschüttelt. Anschließend wird das Serum durch Zentrifugieren bei 400 × g, 3 min bei Zimmertemperatur entfernt. Jedes Zellpellet wird mit 250 µl RPMI-1640 Lösung aufgeschwemmt, und die Lösungen werden zusammengegeben.

Die Ermittlung der Hefenkonzentrationen erfolgt anschließend in der Zählkammer.

Aufbereitung des Blutes

Materialien:

1. Vetren 200 (Promonto)
2. Plastikröhrchen 15ml, aus Polypropylen (Roth, Best. Nr. 7933.1)
3. Histopaque 1077 (Sigma, Best.Nr. 1077-1)
4. Dihydroethidium (Sigma, Best.Nr. 7008)
5. Thermomixer (Eppendorf, Best.Nr. 5436)

Aufbereitung:

Frisch entnommenes venöses Vollblut wird mit Vetren 200 heparinisiert, wobei auf 10 ml Vollblut 500 µl Vetren 200 genommen werden — dieses entspricht 5 IE Heparin/ml Blut. Das Blut wird im 15 ml-Röhrchen gründlich mit dem Heparin durchgemischt, ohne daß es zur Schaumbildung kommt.

In die leeren Röhrchen mit 15 ml Inhalt gibt man je 3 ml Histopaque 1077 und überschichtet vorsichtig mit je 2 ml des heparinisierten Vollblutes. Diese Lösung wird unter Lichtschutz bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Innerhalb von 40 bis 45 Minuten setzen sich die Erythrozyten ab, und 900 µl des zellreichen Plasmaüberstandes werden abgenommen. Dieser Überstand wird sofort 1 : 1 mit RPMI-1640 gemischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Im folgenden wird diese Suspension als ZRP bezeichnet (= zellreiches Plasma).

Markierung der Zellen mit Dihydroethidium

1 ml ZRP wird mit 20 µl Dihydroethidium (100 µg/ml) versetzt und für 10 min bei 37°C und 1100U/min im Thermomixer inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wird die Zellsuspension für mindestens 29 min auf Eis gestellt.

Mittels einer Zählkammer erfolgt die Feststellung der Granulozyten/Monozyten-Konzentration in der Suspension.

Einstellen der Hefensuspension auf die gewünschte Konzentration

Für einen Testansatz, in dem Granulozyten/Monozyten *Candida alb.* im Verhältnis 1 : 1 vorliegen sollen, wird folgendermaßen vorgegangen:

Die *Candida*-Suspension wird exakt auf die 10fache Konzentration der Granulozyten/Monozyten-Suspension eingestellt. Im Test wird dann von der Hefen-Suspension nur 1/10 des ZRP benötigt. Dieses Vorgehen hat den Vorteil, daß eine zu starke Verdünnung der Granulozyten/Monozyten-Suspension vermieden wird.

Rechenbeispiel:

ZRP: ermittelte Konzentration an Granulozyten/Monozyten 5×10^6 Zellen/ml

Candida alb.: $1,5 \times 10^8$ Zellen/ml

Die *Candida alb.* Konzentration muß auf 5×10^7 Zellen eingestellt werden: der Verdünnungsfaktor für die *Cand. alb.* Suspension beträgt somit 3. Die Hefensuspension wird mit RPMI-1640 auf die erforderliche Konzentration gebracht.

Durchführung des Tests

Materialien:

1. Thermomixer (Eppendorf Best.Nr. 5436)
2. N-Ethyl-Maleinsäureimid (Sigma, Best.Nr. 4640)
3. Paraformaldehyd (Sigma, Best.Nr. P-6148)
4. Antikörper CD13-RPE (Dako, Best.Nr. R715)
5. NaN_3 (Sigma, Best.Nr. S 2002)
6. PBS-Glu-Lösung
7. Triton X-100 (Sigma, Best.Nr. X100)
8. Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (= Tween 20; Sigma, Best.Nr. P1379)
9. Ethidium-homodimer-1 (Molecular Probes, Best.Nr. E-1169)
10. Kühlzentrifuge (Hettich, Roto Silenta (K))
11. Vortex-Genie (Bender & Hobein)
12. Reagenzröhrchen aus Polypropylen 5,2ml (Roth, Best.Nr. 7948.1)

Vorbereitung der erforderlichen Lösungen

N-Ethyl-Maleinsäure-imid-Lösung: (NEM) 1.251 g

NEM wird in 100 ml PBS gelöst. Diese Lösung wird portionsweise bei -20°C aufbewahrt. Vor dem Gebrauch wird die eingefrorene Lösung aufgetaut und im Verhältnis 1 : 10 mit PBS-Glu-Lösung verdünnt (entsprechend: 10 mM-Lösung).

Paraformaldehyd-Lösung

Eine 1%ige Paraformaldehydlösung in PBS-Glu-Lösung wird durch Erwärmen bei max. 60°C hergestellt. Diese Lösung wird portionsweise bei -20°C eingefroren. Für den Test wird die Lösung aufgetaut und 1 : 5 mit PBS-Glu-Lösung verdünnt (entsprechend 0,2%ige Lösung).

Verdünnte Antikörper-Lösung

Je Einzelmessung werden 1,8 µl Antikörper-Lösung benötigt. Diese Lösung wird mit 98,2 µl NaN_3 -Lösung (0,0005%) zu 100 µl verdünnt. Die so hergestellte verdünnte Antikörper-Lösung wird vor dem Test frisch hergestellt.

NaN_3 -Lösung

Eine 0,01%ige NaN_3 -Lösung wird durch Auflösen in PBS-Glu hergestellt. Diese Lösung wird 1 : 20 mit PBS-Glu-Lösung verdünnt (entsprechend 0,0005%).

Lyse-Lösung für Granulozyten und Monozyten

500 µl Triton X-100 und 500 µl Tween 20 werden in 100 ml bidest. Wasser gelöst und anschließend sterilfiltriert (Filter: 0,2 µm). Diese Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Ethidium-homodimer-1 Lösung

Eine Stammlösung in PBS-Glu-Lösung wird portionsweise eingefroren. Hiervon wird bei Gebrauch eine 2 µM Lösung in PBS-Glu-Lösung hergestellt.

Testablauf für eine Zeitkinetik

Beispiel: Je drei Proben werden für folgenden Testansatz verwendet:

- Null Minuten
- 5 Minuten
- 10 Minuten
- 20 Minuten
- 40 Minuten

Es werden also insgesamt 15 Proben benötigt.

Die entsprechende Anzahl von Eppendorf-Reagenzgefäßen wird folgendermaßen vorbereitet:

Die Gefäße werden auf Eis für mind. 10 min gekühlt, und in jedes Reaktionsgefäß gibt man 300 µl eiskalte RPMI-1640 Lösung. In die Proben für Null Minuten werden zusätzlich 600 µl eiskalte NEM-Lösung gegeben.

In jedes der Reaktionsgefäße gibt man 150 µl Suspension, bestehend aus Granulozyten/Monozyten-Hefen-Gemisch, im Verhältnis 1 : 1. Für 15 Proben wird insgesamt 2,25 ml Suspension benötigt. Die Suspension wird unter Eiskühlung im Polypropylenröhrchen vorbereitet: dazu werden 2,1 ml ZRP mit 0,1 ml der eingestellten *Candida*-Suspension mittels des Vortex-Gerätes gut

ermischt.

Die Proben für Null Minuten werden (Vortex-Genie) durchgemischt und bleiben unter Eiskühlung. Die restlichen Proben werden — nach Verschließen der Reaktionsgefäße — sofort bei 37°C und 1100 U/min in den Thermomixer gestellt.

Nach den jeweiligen Zeiten (5, 10, 20 und 40 Minuten) werden die Proben sofort auf Eis gestellt und mit je 600 µl eiskalter NEM-Lösung gemischt (Vortex-Gerät). Die Proben bleiben unter Eiskühlung.

Zur Bestimmung von Phagozyten, Burst und Killing werden die Proben anschließend geteilt

Dazu werden 15 vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße bereitgehalten. Zur Detektion des Killing pipetiert man je Probe 700 µl des Reaktionsgemisches in die Eppendorf-Gefäße. Die verbliebenen 350 µl Suspension werden zur Bestimmung von Phagozytose und Burst benötigt.

Phagozytose und Burst

Die Eppendorf-Reaktionsgefäße (mit 350 µl Suspension) werden bei 200 bis 600 × g, 4°C und 2 bis 16 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig — unter Eiskühlung der Proben — entfernt, und der Rückstand wird mit je 100 µl verdünnter Antikörper-Lösung gemischt (Vortex-Gerät). Die so behandelten Proben verbleiben für 1 Stunde unter Eiskühlung — oder 30 Minuten bei Zimmertemperatur. Anschließend werden die Proben mit 200 µl PBS-Glu-Lösung gemischt und bei 4°C, 200 bis 600 × g, für 2 bis 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und der Rückstand in je 400 µl Paraformaldehydlösung (0,2%) aufgenommen.

Anschließend erfolgt die Messung im Durchflußzytometer.

Killing

in die Eppendorf-Gefäße mit 700 µl Suspension gibt man 150 µl Lyse-Lösung (für alle humanen Zellen), vermischt gut (Vortex-Genie) und stellt die Proben bei 37°C und 1100 U/min für 2 bis 15 Minuten in den Thermomixer. Anschließend werden die Proben sofort auf Eis gestellt und für 2 bis 15 Minuten bei 2 bis 10°C und 500 bis 1500 × g zentrifugiert.

Der Überstand wird unter Eiskühlung vorsichtig entfernt, und der Rückstand wird in 100 µl Ethidium-homodimer-1-Lösung aufgenommen (Vortex-Genie). Die Proben werden für 5 bis 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wird mit 300 µl PBS-Glu-Lösung gut vermischt, und die Proben verbleiben bis zur Messung im Durchflußzytometer auf Eis.

Messung der Proben im Durchflußzytometer

Phagozytose

Die Einstellung des Gerätes erfolgt mit den Proben bei Null Minuten, da hier noch keine Reaktion stattgefunden hat. Es wird eine Histogramm-Darstellung mit zwei Parametern gewählt: X-Achse log F11 und Y-Achse log F12. Die PMT-Spannungen der Fluoreszenzen und die Kompensation der beiden Fluoreszenzen wird so eingestellt, daß die grün gefärbten Candida auf der X-Achse liegen und die orange gefärbten Granulozyten

und Monozyten auf der Y-Achse. Die ungefärbten Zellen dürfen keine Fluoreszenz-Intensität aufweisen.

Für die Darstellung der Zellgranularität wird log-SSC gewählt und für die Zellgröße lin-FSC.

Bei dem Counter-Profile II mit Power Pack hat sich folgende Einstellung bewährt:

- log-F11 : PMT = 1060
- log-F12 : PMT = 1170
- log-SSC : PMT = 355
- lin-FSC : Verstärkung = 5
- Schwellwert (Threshold) : FSC = 55
- Kompensation:
- 1F11 — 10% 1F12
- 1F12 — 37% 1F11

Für die anschließende Messung wird ein Testprogramm eingestellt, das folgende Histogramme enthält (Fig. 2):

1. Histogramm: Y-Achse: log-F12, X-Achse: log-SSC
2. Histogramm: Y-Achse: Anzahl der Ereignisse, X-Achse: log-F11
3. Histogramm: Y-Achse: log-F11, X-Achse: log-SSC
4. Histogramm: Y-Achse: Anzahl der Ereignisse, X-Achse: log-F12

Im Histogramm 1 wird ein sog. Bitmap um die F12 gefärbten Granulozyten und Monozyten gesetzt. Die in diesem Gate eingegrenzten Zellen werden im Histogramm 2 detektiert.

Im Histogramm 3 wird ein Bitmap gesetzt, das sämtliche Ereignisse der X-Achse (log-SSC) erfaßt, aber auf der Y-Achse erst ab der F11-gefärbten Candida beginnt. Die in diesem Gate eingegrenzten Zellen werden im Histogramm 4 detektiert.

Die Messung der Proben endet, wenn 2500 Zellen im Bitmap 1 erreicht sind. Dies entspricht einer Messung der Gesamtzellzahl von ca. 10 000. (Das Stopkriterium wurde auf die Zahl der Granulozyten/Monozyten begrenzt, da allein die Zahl der Granulozyten/Monozyten in den Proben konstant bleibt.)

Folgende Parameter können detektiert werden:

- Die Zahl der an der Phagozytose beteiligten Granulozyten und Monozyten: gemessen durch den Anteil an Granulozyten/Monozyten, die eine Fluoreszenz-1-Färbung aufweisen (Histogramm 1).
- Die Zahl der Candida, die phagozytiert wurden: gemessen durch den Fluoreszenz-2-Anteil im Histogramm 4.

Variante

Anhand der unterschiedlichen Granularität können Granulozyten und Monozyten differenziert werden. Durch Eingrenzen von nur Granulozyten oder Monozyten im Bitmap kann die Phagozytosefähigkeit beider Zelltypen unterschieden werden.

Burst

Granulozyten und Monozyten, die eine Burst-Aktivität aufweisen, sind — durch Oxidation von Dihydroethidin — rotfluoreszierend. Die Fluoreszenz läßt sich in Fluoreszenz 2 und Fluoreszenz 3 detektieren. Da die

Granulozyten und Monozyten durch den Phycoerythrin gekoppelten Antikörper bereits in Fluoreszenz 2 gefärbt vorliegen, ist die Steigerung der Intensität in Fluoreszenz 2 zwar gut zu beobachten, läßt sich aber nur unzureichend quantitativ als Burst-Aktivität bestimmen. Deshalb erfolgt die Auswertung in Fluoreszenz 3, wo Phycoerythrin nicht erscheint.

Zusätzlich zu den Parametern des Phagozytostests wird log-Fluoreszenz 3 in den Test aufgenommen. Der FCS wird als sog. non-gating Parameter gesetzt, und log-Fl3 wird — wie log-SSC, log-Fl2 und log-Fl1 — sog. gating Parameter. Die PMT-Spannung für log-Fl3 wird so gewählt, daß bei den Proben für Null-Minuten (keine Reaktion) keine Zellen in Fluoreszenz 3 erscheinen.

Folgende Einstellung hat sich im Profil II mit Power Pack bewährt:

- log-Fl1 : PMT = 1060
- log-Fl2 : PMT = 1170
- log-Fl3 : PMT = 1090
- log-SSC : PMT = 355
- lin-FSC : Verstärkung = 5
- Schwellwert (Threshold) = 55
- Kompensation:
- 1Fl1 — 10% 1Fl2
- 1Fl2 — 35% 1Fl1

Für die anschließende Messung wird ein Testprogramm eingestellt, das folgende Parameter enthält (Fig. 3):

1. Histogramm: Y-Achse: log-Fl2, X-Achse: log-SSC
2. Histogramm; Y-Achse: Anzahl der Ereignisse, X-Achse: log-Fl3
3. Histogramm: Y-Achse: log-Fl1, X-Achse: log-SSC
4. Histogramm: Y-Achse: Anzahl der Ereignisse, X-Achse: log-Fl3

Im Histogramm 1 wird ein sog. Bitmap um die Fl2 gefärbten Granulozyten und Monozyten gesetzt. Die in diesem Gate eingegrenzten Zellen werden im Histogramm 2 detektiert.

Im Histogramm 3 wird ein Bitmap gesetzt, das sämtliche Ereignisse der X-Achse (log-SSC) erfaßt, aber auf der Y-Achse erst ab der Fl1-gefärbten Candida beginnt. Die in diesem Gate eingegrenzten Zellen werden im Histogramm 4 detektiert.

Die Messung der Proben endet, wenn 2500 Zellen im Bitmap 1 erreicht sind. Dies entspricht einer Messung der Gesamtzellzahl von ca. 10.000.

Folgende Parameter können detektiert werden:

- Gesamtzahl der Granulozyten/Monozyten, die eine Burst-Aktivität aufweisen; meßbar im Histogramm 2. (Durch ein Bitmap nur um die Granulozyten oder Monozyten kann deren Burst-Aktivität selektiv detektiert werden.)
- Anzahl der Granulozyten und Monozyten, die an der Phagozytose beteiligt sind und zudem eine Burst-Aktivität aufweisen. Dieser Parameter wird im Histogramm 4 detektiert.

Zu einem gleichen Ergebnis wie in Histogramm 4 gelangt man mit folgenden Histogrammen — dies dient gleichzeitig als Überprüfung der Methode:

1. Histogramm: Y-Achse: log-Fl2, X-Achse: log-SSC
2. Histogramm: Y-Achse: Anzahl der Ereignisse, X-Achse: log-Fl1
3. Histogramm: Y-Achse: Anzahl der Ereignisse, X-Achse: log-Fl3

Im Histogramm 1 wird ein Bitmap um die Granulozyten-Monozyten gesetzt, und im Histogramm 2 werden die Ereignisse in diesem Bitmap detektiert. Wie im Phagozytostest werden hier nur die Granulozyten/Monozyten erfaßt, die an der Phagozytose beteiligt sind. Im Histogramm 2 wird dann ein Bitmap um die phagozytierenden Zellen gesetzt, und dieses Bitmap wird im Histogramm 3 erfaßt. Damit erscheinen im Histogramm 3 nur Granulozyten/Monozyten, die eine Burst-Aktivität aufweisen.

Killing

Gemessen wird der Anteil an Candida alb., die am Absterben sind bzw. bereits abgetötet sind. Die Einstellung der Parameter im Zytometer erfolgt so, daß tote Candida — mit Ethidium-homodimer-1 angefärbt eine deutliche Fluoreszenz-3-Intensität aufweisen. Lebende Zellen — mit Calcein-AM markiert — sollen keine Fluoreszenz-3-Intensität aufweisen.

Folgende Einstellung hat sich im Profile II mit Power Pack bewährt:

- log-Fl1 : PMT = 1060
- log-Fl3 : PMT = 780
- log-SSC : PMT = 355
- lin-FSC : Verstärkung = 5
- Schwellwert (Threshold) = 40

Für die Messung der Killing-Aktivität wird ein Testprogramm eingestellt, das folgende Histogramme enthält (Fig. 4):

1. Histogramm: Y-Achse: log-Fl3, X-Achse: log-Fl1
2. Histogramm: Y-Achse: Zahl der Ereignisse, X-Achse: log-Fl3

Im Histogramm 1 werden durch ein Fadenkreuz vier Quadranten eingestellt, die ausgewertet werden können. Im Histogramm 2 werden alle Zellen mit einer Fluoreszenz-3-Intensität gemessen. Durch einen zuvor definierten Schwellwert — tote Zellen werden mit Ethidium-homodimer-1 angefärbt — werden alle toten und absterbenden Zellen definiert.

Folgende Parameter können bestimmt werden:

- Gesamtzahl der abgetöteten, absterbenden und lebenden Candida alb. Zellen.

Im Histogramm 1 enthält Quadrant 1 die toten Zellen (Fl3), Quadrant 2 erfaßt die absterbenden Zellen (Fl3 und Fl1), Quadrant 3 enthält alle ungefärbten Zellen, und im Quadrant 4 (Fl1) liegen die lebenden Zellen.

Im Histogramm 2 werden sowohl die toten als auch die absterbenden Zellen erfaßt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt so, daß der Prozentanteil an Fluoreszenz-3 bei Null Minuten von allen nachfolgenden Ergebnissen abgezogen wird. Der Anteil an Fluoreszenz-3-gefärbten Zellen ist bei Null Minuten nicht Null, da Hefen durch die Behandlung im

Zytometer (Laserlicht, Ansaugen der Zellen) geringfügig geschädigt werden. Außerdem werden durch die Lyse-Lösung geringe Anteile an Granulozyten-Bruchteilen in Fluoreszenz-3 miterfaßt, und ein kleiner Anteil an Hefenzellen wird durch die Lyse-Methode geschädigt. 5

Im vorliegenden Beispiel wird die Lyse-Aktivität im ZRP — mit den löslichen und festen Faktoren — erfaßt. Grundsätzlich kann auch nur die Lyse-Aktivität der zellulären Faktoren erfaßt werden. Dazu ist es erforderlich, daß Parallelproben gemessen werden, die aus einem zellfreien Plasma (ZFP) — gewonnen durch Abzentrifugieren des ZRP — mit *Candida alb.* bestehen. Die Differenz der Ergebnisse aus ZRP — ZFP ergibt die Killing-Aktivität des zellulären Anteils. 10 15

Da aufgrund von mehr als 50 verschiedenen Testreihen der Killingteil im ZFP als vernachlässigbar eingestuft werden konnte, ist in Vergleichsmessungen der ZFP-Anteil zu vernachlässigen. 20

Varianten des Testansatzes

Bestimmung von Phagozytose, Burst und Killing im Vollblut

Besondere Materialien:

- Lyse-Lösung für Erythrozyten:
- NH_4Cl (Sigma, Best.Nr. A-4514) 8,27 g
- KHCO_3 (Sigma, Best.Nr. P-6164) 1,00 g
- Na_4EDTA (Sigma, Best.Nr. ED4S) 0,04 g

Die Substanzen werden in einem Liter bidest. Wasser gelöst und anschließend steriltfiltriert. Diese Lösung wird gut verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt. 35

Vorgehen bei Vollblut:

Anstelle von ZRP wird Vollblut verwendet. (Das Überschichten des Blutes über Histopaque entfällt.)

Killingtest:

Keine Änderung gegenüber Methode mit ZRP. 40

Phagozytose- und Bursttest:

Nach Anfärben der Granulozyten für 1 Stunde auf Eis gibt man zu den Proben — mit je 100 µl verdünnter Antikörper-Lösung — 1ml Lyse-Lösung und läßt sie für 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wird zentrifugiert: 4°C, 5 min und 250 x g. Die Zellen werden einmal mit PBS-Glu-Lösung gewaschen, und der Rückstand wird in 400 µl 0,2%iger Paraformaldehyd-Lösung aufgenommen. 45 50

Quenchen der noch nicht phagozytierten *Candida alb.*

Quench-Lösung für den Phagozytostest:

- Azur A (Sigma, Best.Nr. A-6270) : 300 mg in 100 ml PBS-Lösung (steriltfiltriert: 0,2 µm)

Vorgehen bei Quenchen:

Nach dem Teilen der Proben für den getrennten Testansatz für Killing und Phagozytose/Burst wird die Phagozytose/Burst-Probe nochmals geteilt: von den insgesamt 350 µl werden 175 µl für den Bursttest wie beschrieben verwendet. 60

Für das Quenchen im Phagozytostest wird folgendermaßen vorgegangen: 65

- 175 µl der Suspension werden bei 4°C, 250 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird

vorsichtig entfernt und der Rückstand wird in 150 µl Azur-A-Lösung aufgenommen und bei 37°C, 1100 U/min für 10 Minuten im Thermomixer inkubiert. Die Proben werden mind. dreimal mit PBS-Lösung gewaschen (blaue Farbe muß entfernt sein). Der Rückstand wird anschließend mit 100 µl verdünnter Antikörper-Lösung versetzt und für 1 Stunde auf Eis belassen. Weitere Behandlung der Proben wie beschrieben.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Phagozytose- und/oder Killingfähigkeit von phagozytierenden Zellsystemen wie Granulozyten, Monozyten oder Makrophagen (Phagozyten) mit folgenden Verfahrensschritten:

- a) daß man Phagozyten mit einer definierten Menge von mit Fluoreszenz-Farbstoff markierten Mikroorganismen versetzt (Probe),
- b) daß die so hergestellte Probe zu einem eine definierte Menge Glucose enthaltenden gepufferten Nährmedium gegeben wird,
- c) daß anschließend in an und für sich bekannter Weise inkubiert wird,
- d) daß die Phagozytose und das Killing durch Kühlung und/oder eine Stopplösung gestoppt wird,
- e) daß anschließend die Phagozytosefähigkeit bestimmt wird, indem zur Markierung der Phagozyten die Probe mit einer definierten Menge eines fluoreszierenden Antikörpers versetzt wird, und daß dann die Bestimmung der Phagozytose mittels eines Fluoreszenz-Zytometers erfolgt, und/oder
- f) daß anschließend an Verfahrensschritt d) die Killingfähigkeit bestimmt wird, indem alle humanen Zellen lysiert werden und eine Markierung der abgetöteten Mikroorganismen mittels eines für die lebenden Zellen zellimpermeablen fluoreszierenden Farbstoffes durchgeführt wird, und daß anschließend die Killingfähigkeit mittels eines Fluoreszenz-Zytometers bestimmt wird,

wobei die Emissionsmaxima der eingesetzten Farbstoffe verschieden sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Phagozyten vor dem Versetzen mit den markierten Mikroorganismen (Verfahrensschritt a) zu einem Glucose enthaltenden gepufferten Nährmedium zugefügt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Versetzen der Phagozyten mit den markierten Mikroorganismen (Verfahrensschritt a) die Phagozytenkonzentration bestimmt wird.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen lebende Hefen, Pilzzellen oder grampositive oder gramnegative Bakterien als Zellen sind.

5. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Hefe *Candida albicans* ist.

6. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen vor dem Versetzen mit den Phagozyten (Verfahrensschritt a) mit einer Waschlösung behandelt werden.

7. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff zum Anfärben der Mikroorganismen aus Fluorescein, Rhodamin oder Sulforhodamin bzw. deren Derivate ausgewählt ist. 5
8. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroorganismen vor dem Versetzen mit den Phagozyten (Verfahrensschritt a) mit einem Glucose enthaltenden gepufferten Nährmedium versetzt werden. 10
9. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Versetzen der Phagozyten mit den gefärbten Mikroorganismen die Mikroorganismen-Konzentration bestimmt wird. 15
10. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Zeitspanne von 0 bis 120 min bei 30 bis 40°C, bevorzugt bei 35 bis 38°C, inkubiert wird.
11. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Phagozytose durch Eiskühlung und eine Stopplösung, bevorzugt N-Ethylmaleimid (NEM), gestoppt wird. 20
12. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der fluoreszierende Antikörper zur Markierung im Verfahrensschritt e) ein CD 13, CD 14 oder CD 15 direktmarkierter Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff wie R-Phycoerythrin ist. 25
13. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß beim Verfahrensschritt f) nach der Lysierung eine Zentrifugation erfolgt. 30
14. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der zellimpermeable Farbstoff Ethidium-homodimer-1, bevorzugt Ethidium-diazid, oder eine Oxazolium- oder Thiazolium-Verbindung ist. 35
15. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das gepufferte Nährmedium bei 35 bis 39°C — bevorzugt bei 37°C — im pH-Bereich von 7,2 bis 7,6 — bevorzugt zwischen 7,2 und 7,4 — liegt und einen Glucoseanteil aufweist, der zwischen 0,4 und max. 20% liegt. 40
16. Verfahren zur Bestimmung der Phagozytose- und/oder Killing und/oder Burstfähigkeit von Phagozyten, dadurch gekennzeichnet, daß ein Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 15 durchgeführt wird mit der Maßgabe, daß beim Verfahrensschritt a) oder b) oder c) die Phagozyten mit einer membrangängigen Substanz, die durch nachfolgende Oxidation zu einem fluoreszierenden Farbstoff umgewandelt wird, behandelt wird, und daß nach der Bestimmung der Phagozytose die Burstbestimmung mittels eines Fluoreszenz-Zytometers vorgenommen wird, wobei die Emissionsmaxima von drei der eingesetzten Farbstoffe verschieden sind. 45
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die membrangängige Substanz Dihydroethidium oder Dihydroethidium 1, 2, 3 oder 5(6) Carboxy-2',7'-dichlorhydrofluoresceindiacetat-bis(acetoxymethyl)ester ist. 50
18. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das Verfahren mit Vollblut oder mit aus Vollblut oder Gewebe isolierten phagozytierenden Zellsystemen 55

durchgeführt wird.

19. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß beim Verfahrensschritt a) eine Quenchung der Mikroorganismen durchgeführt wird.

20. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß vor dem Versetzen der Mikroorganismen mit den Phagozyten eine Opsonierung der Mikroorganismen in an und für sich bekannter Weise durchgeführt wird.

21. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß beim Verfahrensschritt e) der zur Markierung vorgesehene Antikörper mit einer NaN_3 -Lösung behandelt wird.

22. Reagentienkit zur Bestimmung der Phagozytose, dadurch gekennzeichnet, daß es

- a) lyophilisierte Mikroorganismen,
- b) einen Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen,
- c) eine Puffersubstanz,
- d) einen direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Markierung der Phagozyten

getrennt voneinander enthält.

23. Reagentienkit zur Bestimmung des Killings, dadurch gekennzeichnet, daß es

- a) lyophilisierte Mikroorganismen,
- b) eine Puffersubstanz,
- c) eine Lösung zur Lyse aller humanen Zellen,
- d) einen zellimpermeablen Fluoreszenz-Farbstoff

getrennt voneinander enthält.

24. Reagentienkit zur Bestimmung des Burst, dadurch gekennzeichnet, daß es

- a) lyophilisierte Mikroorganismen,
- b) einen Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen,
- c) eine Puffersubstanz,
- d) eine farblose zu einem Fluoreszenz-Farbstoff oxydierbare membrangängige Substanz zur Behandlung der Phagozyten,
- e) einen direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Markierung der Phagozyten

getrennt voneinander enthält.

25. Reagentienkit zur Bestimmung der Phagozytose und/oder Burst- und/oder Killingfähigkeit, dadurch gekennzeichnet, daß es

- a) lyophilisierte Mikroorganismen,
- b) einen Farbstoff zur Markierung der Mikroorganismen,
- c) eine Puffersubstanz,
- d) eine farblose zu einem Fluoreszenz-Farbstoff oxydierbare membrangängige Substanz zur Behandlung der Phagozyten,
- e) einen direkt fluoreszenzmarkierten Antikörper zur Markierung der Phagozyten,
- f) eine Lösung zur Lyse aller humanen Zellen,
- g) einen zellimpermeablen Fluoreszenz-Farbstoff zur Markierung für das Killing

getrennt voneinander enthält.

26. Reagentienkit nach Anspruch 22 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die lyophilisierten Mikroorganismen *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus A* oder *Streptococcus B*, *Escherichia coli* sind.

27. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Farbstoff zur Anfärbung der Mikroorganismen aus

Fluorescein, Rhodamin oder Sulforhodamin bzw. deren Derivate ausgewählt ist.

28. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Puffersubstanz RPMI-1640 mit 4,5 g/l D-Glucose ist.

29. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich als Waschlösung und zur Farbstoffinkubation der Mikroorganismen getrennt von den anderen Bestandteilen eine PBS-Glucoselösung (mit 0,45% Glucose) enthalten ist.

30. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich getrennt eine Quenchlösung, z. B. Azur-A-Lösung, enthalten ist.

31. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß die farblose oxydierbare membrangängige Substanz zur Messung der Burst-Aktivität Dihydroethidium oder Dihydrorhodamin 1, 2, 3 oder 5(6) Carboxy-2',7'-dichlordihydrofluoresceindiacetatbis(acetoxymethyl)ester ist.

32. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß der zellimpermeable Fluoreszenz-Farbstoff für den Killingtest Ethidium-homodimer-1 oder bevorzugt Ethidium-diazid oder eine Oxazolium- oder Thiazolium-Verbindung ist.

33. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper zur Markierung für die Phagozytose ein CD 13, CD 14 oder CD 15 direktmarkierter Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff wie R-Phycoerythrin ist.

34. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich getrennt von den anderen Bestandteilen ein Nährmedium, bevorzugt Tryptic-Soy-Broth, enthalten ist.

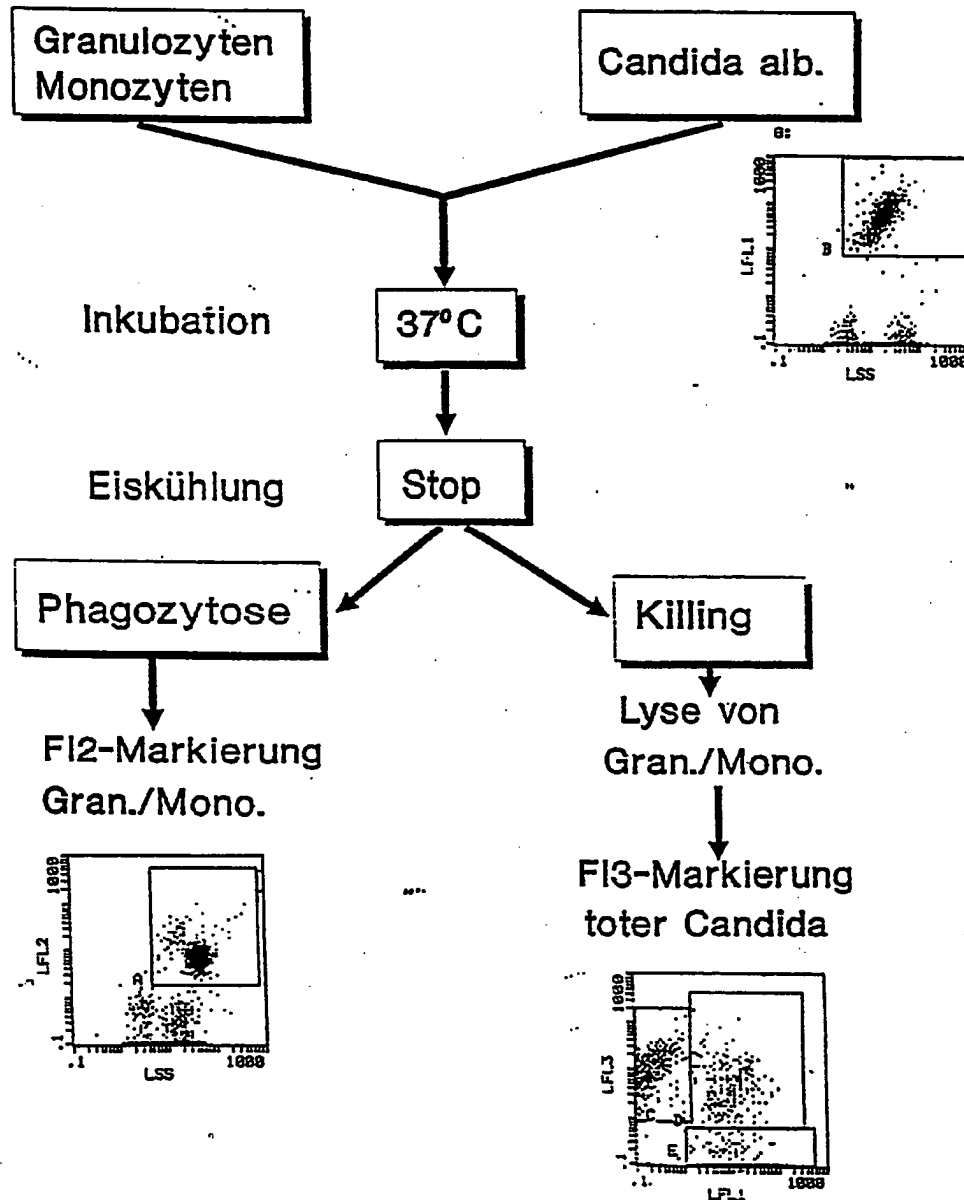
35. Reagentienkit nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich eine NaN_3 -Lösung getrennt von den anderen Bestandteilen enthalten ist.

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

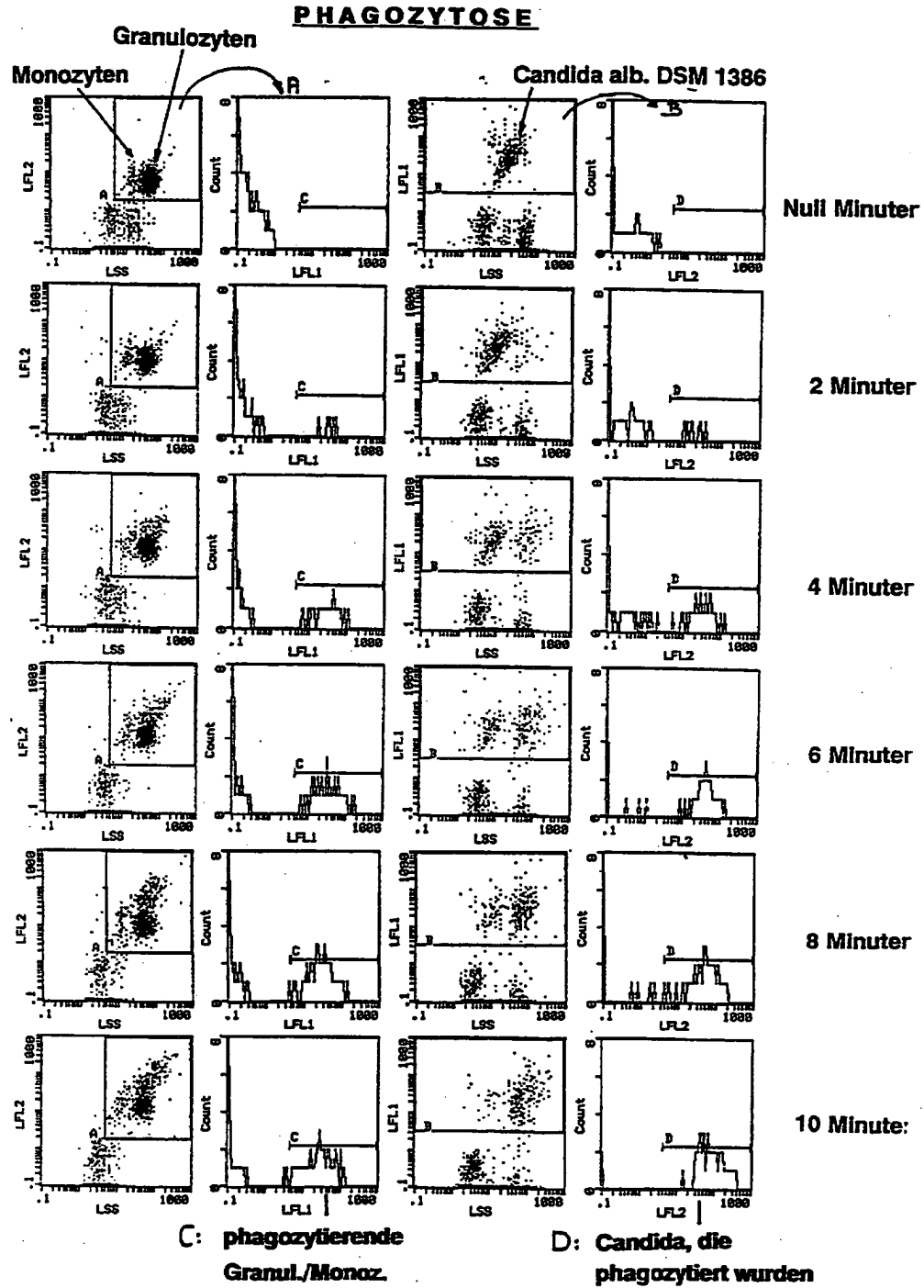
- Leerseite -

Figur 1:

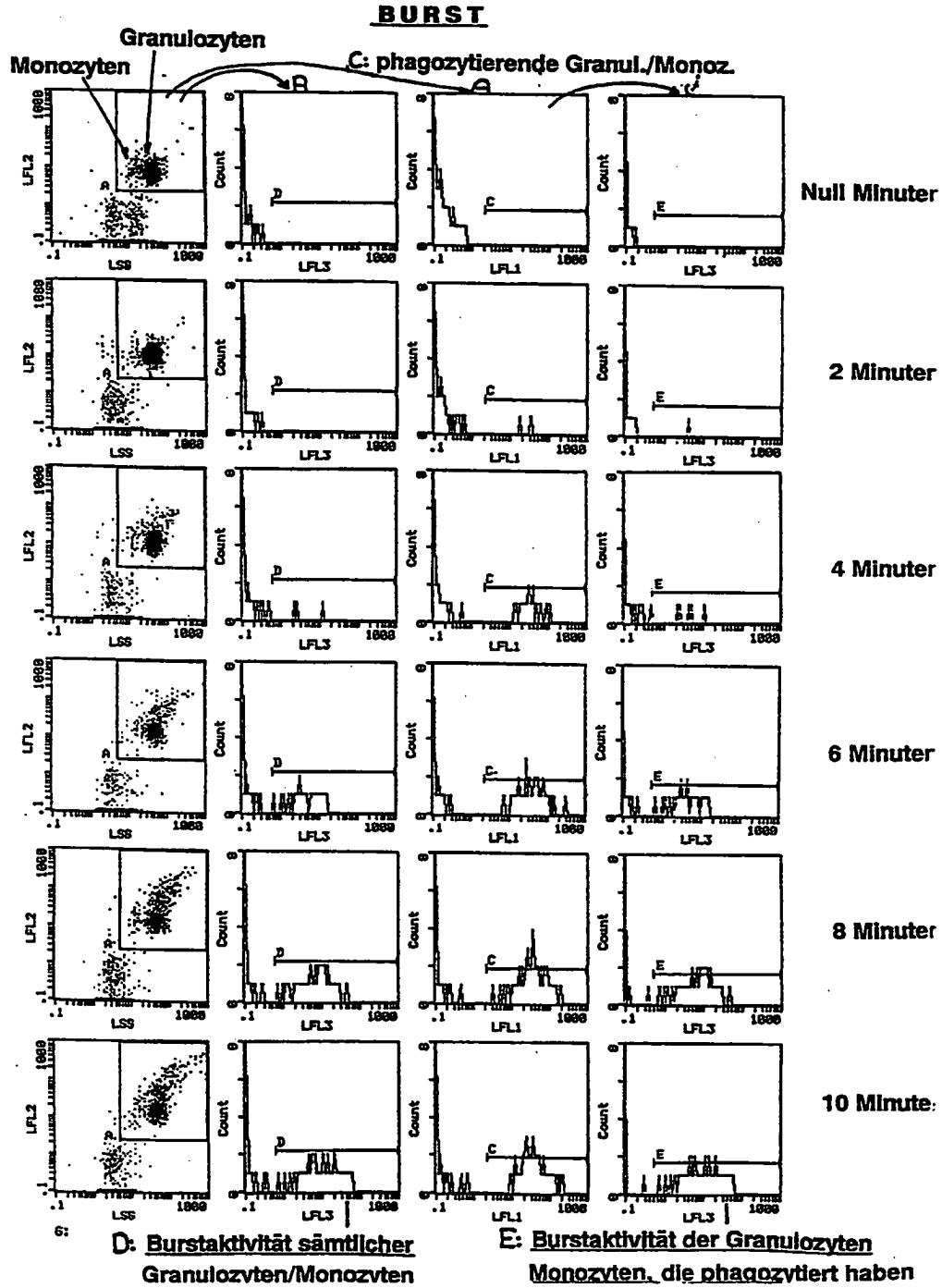
TESTPRINZIP



Figur 2



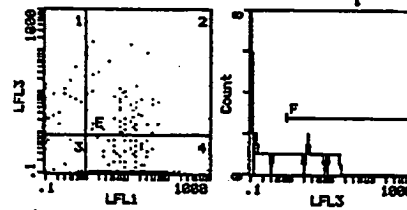
Figur 3



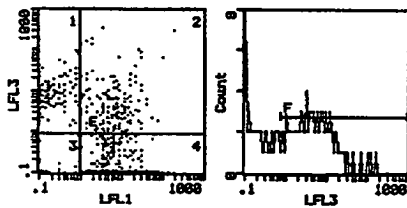
Figur 4

KILLING

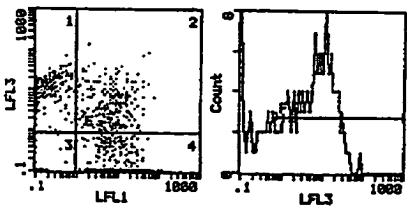
F: % - Anteil an abgetöteten
Candida alb.



Null Minuten



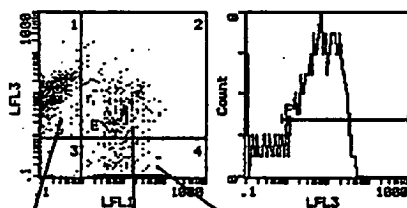
10 Minuten



20 Minuten



40 Minuten



60 Minuten

† tote Candida alb.

4: lebende Candida alb.

2: absterbende Candida alb.